Aus dem Institut für Virologie und Immunbiologie der

Universität Würzburg

Direktor: Prof.Dr.E.Wecker
Prof.Dr.V.ter Meulen

Isolierung und Charakterisierung von temperatursensitiven Mutanten des murinen Coronavirus JHM

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n

verfaßt und der

Hohen Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

zur

Erlangung der medizinischen Doktorwürde

vorgelegt von

Christoph Hügelschäffer

aus Würzburg

Würzburg, den 19.12.1979

1980

Aus dem Institut für Virologie und Immunbiologie der

Universität Würzburg

Direktor: Prof.Dr.E.Wecker
Prof.Dr.V.ter Meulen

Isolierung und Charakterisierung von temperatursensitiven Mutanten des murinen Coronavirus JHM

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n

verfaßt und der

Hohen Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

zur

Erlangung der medizinischen Doktorwürde

vorgelegt von

Christoph Hügelschäffer

aus Würzburg

Würzburg, den 19.12.1979

Referent: Prof.Dr.V.ter Meulen

Korreferent: Prof.Dr.K.Koschel

Dekan: Prof.Dr.K.-H.Wulf

Tag der mündlichen Prüfung: 16.6.1980

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität Würzburg

Inhaltsverzeichnis

Einleitung	1
Material und Methoden	6
Ergebnisse	17
Diskussion	29
Tabellen	34
graph. Darstellungen	42
Literaturverzeichnis	52

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543521_0047

E I N L E I T U N G

Coronaviren sind RNA-haltige Viren, die im Elektronenmikroskop den Orthomyxoviren ähneln. Im Gegensatz zu diesen sind die Vorstülpungen auf der Virusoberfläche jedoch nicht stachel-, sondern blattförmig. Da der Rand dieser Vorstülpungen im Aussehen an den Strahlenkranz der Sonne erinnert, erhielt die Gruppe den Namen Coronaviren.(21)

Bis vor wenigen Jahren wurden Coronaviren nur auf Grund dieser morphologischen Kriterien zu einer Gruppe zusammengefaßt.(25) Die biochemische Charakterisierung der Coronaviren erlaubt nun eine wesentlich bessere Abgrenzung dieser Gruppe. Das Genom dieser Viren besteht aus einem relativ großen RNS-Strang mit einem Molekulargewicht von ca. 5,4 - 8 x 10^6 Dalton.
Das Genom hat die Eigenschaften einer messenger-RNS. (23,35,41). Nach dem Klassifikationsschema von Baltimore (2) werden die Coronaviren daher den positivsträngigen RNS-Viren der Gruppe IV b zugeordnet.
Das Virion wird von zumindest sechs Proteinen aufgebaut. Die typisch keulenförmigen Stacheln bestehen aus mindestens zwei Glykoproteinen, die in einer Lipidhülle stecken.(42)
Bei den verschiedensten Tierspezies und beim Menschen rufen die Coronaviren mannigfaltige Krankheiten hervor. So erzeugen sie vorwiegend bei Kindern Erkrankungen des Respirationstraktes, wie Bronchiolitis und Pneumonie. 5 - 10 Prozent aller Personen mit Symptomen des "banalen Schnupfens" bilden Antikörper gegen Coronaviren.(8)

Coronaviren verursachen auch die infektiöse Bronchitis der Vögel, Diarrhoe bei Kälbern und Hunden; übertrag-

bare Gastroenteritis und Enzephalitis bei Schweinen und Peritonitis bei Katzen.(25,40) Das MHV (mouse- hepatitis--virus)-Virus aus der Gruppe der Coronaviren führt bei Nagetieren zu Hepatitis, einige neurotrope Varianten auch zu demyelinisierenden Enzephalitiden.(28)

Gerade diese neurotropen Stämme, zu denen auch das Coronavirus JHM gehört, haben für experimentelle Untersuchungen subakuter und chronischer Erkrankungen des Zentralnervensystems (ZNS) an Interesse gewonnen. Der Abbau von Myelinscheiden als direkte oder indirekte Folge einer Virusinfektion des ZNS ist ein charakteristischer neuropathologischer Befund einer Reihe von Erkrankungen bei Mensch und Tier.(38) Dazu zählen beim Menschen die subakute sklerosierende Panenzephalitis (SSPE), die progressive Leukoenzephalopathie, Kuru die Jakob-Creutzfeldt-Erkrankung und möglicherweise die multiple Sklerose. Ähnliche neuropathologische Veränderungen werden auch bei der Hundestaupe und bei Visna, einer Erkrankung von Schafen, gefunden. Die pathogenetischen Mechanismen, die zum Abbau der Myelinscheiden und zur Viruspersistenz führen, sind noch weitgehend ungeklärt. Da die Erkrankungsraten sehr gering sind, gelang es bisher noch nicht die Krankheitserreger biochemisch genauer zu untersuchen.

Die Infektion von Mäusen und Ratten mit dem Coronavirus JHM hingegen könnte ein ideales Modell einer virusinduzierten Entmarkungserkrankung darstellen, da wesentliche Kenntnisse über die Biochemie dieses Virus vorliegen (41,42) und detaillierte neuropathologische Untersuchungen an Ratten und Mäusen durchgeführt wurden. (22,26,27,28,44)

So verursacht das JHM- Virus an saugenden Mäusen und Ratten eine akute disseminierte Enzephalomyelitis, die nach einer Inkubationszeit von 3-lo Tagen auftritt. Hierbei werden Nekrosen in allen Teilen des ZNS gefun-

den, sowohl Neurone als auch Oligodendrogliazellen werden zerstört.

Bailey hingegen beobachtete bei Infektion erwachsener Ratten einen wesentlich langsameren Verlauf der Erkrankung.(1)

Bei der Infektion von Ratten im Alter von 20 Tagen wurden von Nagashima et al. (28) drei unterschiedliche Typen einer demyelinisierenden Enzephalomyelitis beschrieben:

1. eine akute Panenzephalitis mit demyelinisierenden Foci, die der bei Mäusen hervorgerufenen Erkrankung gleicht (APE - acute panencephalitis)
2. eine subakute demyelinisierende Enzephalomyelitis (SDE - subacute demyelinating encephalomyelitis)
3. eine nach langer Inkubationszeit auftretende, späte demyelinisierende Enzephalomyelitis (LDE = late demyelinating encephalomyelitis)

Von besonderem Interesse für weitere Forschungen ist das Krankheitsbild der subakuten demyelinisierenden Enzephalomyelitis (SDE) und der LDE. Die Tiere weisen ausgedehnte Läsionen mit Demyelinisierung ohne die typischen Entzündungszeichen einer akuten Infektion auf. Betroffen von diesen Veränderungen sind das Chiasma opticum und die weiße Substanz des Cerebrum, des Cerebellum, der Pons und des Rückenmarks. Lokalisation und Art der Läsionen erinnern an demyelinisierende Krankheiten des Menschen, wie z.B. multiple Sklerose.

Bei der SDE erkranken die Tiere nach einer Inkubationszeit von ca. 12 - 24 Tagen, bei der LDE treten klinische Erscheinungen erst mehrere Monate nach der Infektion auf. Die neuropathologischen Veränderungen der LDE entsprechen den bei der SDE beschriebenen Beobachtungen; zusätzlich findet man Remyelinisierung und erneutes Auftreten von

Demyelinisierung. Dies weist auf eine Viruspersistenz im ZNS hin.
Eine entscheidende Schwierigkeit für weitere Experimente besteht in der geringen und schlecht reproduzierbaren Erkrankungsrate der Tiere an SDE und LDE.

Einige Autoren hatten für andere Virus-Wirtssysteme beschrieben, daß sich durch konditionell temperatur--sensitive Mutanten eine Änderung des Krankheitsbildes und auch der Erkrankungsrate im Vergleich zum nicht mutierten Virus erzielen läßt.(5,lo,15,17,18,19,31,32, 36,37)

In dieser Arbeit sollte nun versucht werden, Mutanten zu isolieren, die mit größerer Wahrscheinlichkeit als der Wildtyp demyelinisierende Erkrankungen des ZNS verursachen. Auf diese Weise soll ein geeignetes reproduzierbares Tiermodell für demyelinisierende subakute Entzündungen aufgebaut werden.
Neben dieser aus medizinischer Sicht vorrangigen Zielsetzung, darf nicht unerwähnt bleiben, daß mit Hilfe von Mutanten eine ganze Reihe biochemischer und genetischer Fragen beantwortet werden können.
So dienen Mutanten nicht nur der Aufstellung einer detaillierten Genkarte, sondern auch der Erhellung wichtiger Schritte der Virusreplikation. Weiterhin kann durch Untersuchung der Mutanten die Anzahl der Gene, die das Virusgenom ausmachen bestimmt, und es kann die Funktion der einzelnen Gene geklärt werden. Schließlich wird eine Annäherung an manch ungelöste Probleme der praktischen Virologie erreicht: beispielsweise die Mechanismen, die der Korrelation zwischen Phänotyp und Virulenz des Virus zugrunde liegen, oder die Möglichkeit Mutanten als Impfstämme zu verwenden.(12)

Das Ziel dieser Arbeit war es, geeignete Methoden zur Induktion und Selektionierung von konditionell temperatur-sensitiven Mutanten des Coronavirus JHM zu etablieren und die gefundenen Mutanten biologisch zu charakterisieren. Temperatur-sensitive (ts) Mutanten sind Mutanten, die bei einer niedrigen (permissiven) Temperatur Plaques bilden, bei einer höheren (nicht-permissiven) Temperatur - im Gegensatz zum Wildtyp - jedoch nicht mehr.

Eine größere Zahl genetisch stabiler Mutanten ist eine wichtige Voraussetzung für weitere tierexperimentelle und biochemische Untersuchungen.

M A T E R I A L U N D M E T H O D E N

Zellen und Virus

Das JHM- Virus - ursprünglich eine Suspension aus Mäusegehirnen - wurde von Dr.L.Weiner, Johns Hopkins University, Baltimore, USA zur Verfügung gestellt. Das Virus ließ sich auf L 929 - Zellen und auf Sac(-) Zellen vermehren.

Die L 929 - Zellen stammen von der American Type Culture Collection; die Sac(-) Zellen, eine murine Rhabdomyosarkom-Linie, wurden freundlicherweise von Dr. Mussgay, Bundesforschungsanstalt für Viruskrankheiten der Tiere in Tübingen, bereitgestellt.

Beide Zellarten wurden als Monolayer-Kulturen bei 37°C in Roux-Flaschen gezüchtet. Als Nährmedium diente MEM (minimal essential medium), das pro Liter 50 ml foetales Kälber-Serum (= 5 % FKS), 3 ml Glutamin, 1 ml Antibiotikum (Stammlösung: Penicillin und Streptomycin je 10 %) und ca. 10 ml Natriumbikarbonat (Stammlösung: 5,6 %) enthielt.

Der Zellrasen wurde durchschnittlich zweimal wöchentlich mit 5 ml eines Gemisches aus 1 Teil 0,5%igem Trypsin und 1 Teil Versenpuffer abgelöst. Die auf diese Weise erhaltene Suspension der L- Zellen wurde zu gleichen Teilen in sechs neuen Roux-Flaschen mit jeweils 100 ml Nährmedium weiter zur Vermehrung gebracht. Da die Sac- Zellen beträchtlich langsamer wachsen als L- Zellen, konnten sie nicht wie diese 1:6, sondern nur im Verhältnis 1:2 umgesetzt werden.

Eine dicht bewachsene Roux-Flasche zählte ca. 5×10^7 L- Zellen, bzw. ca. 2×10^7 Sac- Zellen.

Virusvermehrung

Das JHM-Virus wurde durch Passagen im Plaque-Test kloniert und auf L- Zellen angezüchtet. Dazu wurde der Monolayer einer Roux-Flasche mit einer MOI (multiplicity of infection) von 0,05 PFU/Zelle (PFU = plaque forming units) infiziert und anschließend eine Stunde auf 37° C adsorbiert. Als Wachstumsmedium diente MEM mit 5 % FKS. Nach etwa 24 Stunden zeigte der gesamte Zellrasen Synzytia. Zu diesem Zeitpunkt wurde das überstehende Medium als Virusstamm des "Wildtyps" (im Gegensatz zu Mutanten) geerntet und in Portionen zu je 1-2 ml bei -70° C tiefgefroren.

Plaque - Test

Für den Plaque - Test wurden sowohl L- Zellen als auch Sac- Zellen verwendet.

Die in einer Roux-Flasche gewachsenen L- Zellen wurden in ca. 150 ml MEM 5 % FKS (Sac- Zellen, die nicht so dicht wuchsen, nur in 75 ml Medium) suspendiert und auf 30 (im Fall der Sac- Zellen nur 15) Petrischälchen (60 mm Durchmesser) verteilt. Im CO_2-Brutschrank waren die Zellen nach etwa 24 Stunden bei einer Temperatur von 37° C zu einem dichten Rasen ausgewachsen. Nun wurde das Medium entfernt, der Monolayer mit 0,3 ml der jeweils gewünschten Virusverdünnung infiziert und eine Stunde auf 34°C, 37°C, bzw. 39°C inkubiert. Anschließend wurde die Virussuspension abgesaugt, die Zellen mit gewärmtem Medium gründlich gewaschen und mit 5 ml einer 0,8%igen Agarlösung (bestehend aus 1 Teil MEM 5 % FKS, 2 Teilen doppelt konz.MEM 10% FKS und 2 Teilen 2%igem Agar) überschichtet. Die Inkubationszeit betrug auf 37°C und 39°C jeweils 36 Stunden, auf 34°C dagegen 48 Stunden.

Um die entstandenen Plaques besser zählen zu können, wurde der Agaroverlay mit Neutralrot (Verdünnung 1:2000) gefärbt.

Der Virustiter wurde in PFU/ml angegeben.

Mikroplatten - Test

Angesichts der großen Anzahl von Titrationen wurde der Virustiter in den meisten Fällen nicht mit Hilfe des Plaque - Tests, sondern durch einen Mikroplatten-Test bestimmt.

Für diese Titrationen wurden ausschließlich L- Zellen verwendet, die - wie zuvor beschrieben - in MEM mit 5 % FKS suspendiert wurden. Zusätzlich enthielt das Medium noch Refobacin, sodaß dieser Mikroplatten-Test unter nicht allzu strengen sterilen Bedingungen ausgeführt werden konnte.

Die 96 Näpfchen einer Mikroplatte wurden zuerst mit je 0,1 ml der L- Zellsuspension gefüllt; direkt anschließend wurden 0,1 ml der gewünschten Virussuspension, die in Zehnerschritten verdünnt wurde, zugegeben.
Die Mikroplatten wurden nun mit abgeflammtem Stanniolpapier bedeckt und im CO^2-Inkubator bei 34^oC, 37^oC, bzw. 39^oC bebrütet.

Nach 48 Stunden wurde der Zellrasen unter dem Mikroskop in Hinsicht auf einen deutlichen CPE (cytopathischen Effekt) betrachtet und der Virustiter nach der Methode von Reed und Münch berechnet. Der Titer wird hierbei als mittlere Infektionsdosis (ID_{50}) ausgedrückt. Das entspricht definitionsgemäß einer Virusmenge, die bei Verimpfung auf eine größere Zahl von Reagenten bei 50% eine Infektion hervorruft.(4)

Virusmutagenese in vitro mit Natriumnitrit

In Anlehnung an die Methode von Granoff (13) wurden bei Zimmertemperatur 1 Teil Virus, 2 Teile 4 molares Natriumnitrit und 1 Teil 1 molarer TRIS-Puffer in ein Reagenzglas gegeben. Der pH-Wert des Puffers war mit HCl auf verschiedene pH-Werte zwischen 4 und 6 eingestellt. Um sicher zu gehen, daß die inaktivierende Wirkung tatsächlich auf $NaNO_2$ zurückgeführt werden konnte, wurden Kontrollen mitgeführt, in denen $NaNO_2$ durch Kochsalz ersetzt war.

In Zeitintervallen von zwei Minuten wurden von dem oben genannten Gemisch Proben entnommen, die sogleich mit MEM 1:100 verdünnt wurden, um eine weitere Inaktivierung zu verhindern.

Virusmutagenese in vitro mit Hydroxylamin

Wildtyp- Virus wurde in verschiedenen Ansätzen mit 0,5 m und 2 m Hydroxylamin im Verhältnis 1:1 verdünnt.(7) Das Reaktionsgemisch wurde bei Zimmertemperatur inkubiert und stündlich eine Probe entnommen, die 1:10 verdünnt und bei $-70^{\circ}C$ eingefroren wurde. Ähnlich wie bei der Mutagenese mit Natriumnitrit diente auch hier ein Versuchsansatz mit NaCl anstelle von Hydroxylamin als Kontrolle.

Mutagenese in vivo mit 5- Fluoruracil (bzw.Brom-desoxyuridin)

L- Zellen wurden mit dem Wildtyp- Virus in einer Multiplizität (d.h. Virusmenge/Zelle) von 0,015 PFU/Zelle infiziert. Die Adsorptionszeit betrug bei 34°C und 37°C jeweils eine Stunde. Neben 5 % dialysiertem FKS enthielt das Wachstumsmedium verschiedene Konzentrationen an 5- Fluoruracil bzw. Bromdesoxyuridin von 1 millimolar (mM) bis zu 25 mM.

Als Kontrolle diente eine Kultur ohne Mutagen, die bei 37°C nach 14 Stunden, bei 34°C erst nach 25 Stunden ausgedehnte cytopathische Effekte aufwies. Zu diesem Zeitpunkt wurde die überstehende Suspension geerntet und als Virusstamm für die weiteren Versuche zur Isolierung der ts- Mutanten benutzt.

Selektion der ts- Mutanten

Der Titer des mit Mutagenen behandelten Virus wurde mit Hilfe des oben beschriebenen Mikroplatten-Tests bei 37°C bestimmt. Virusstämme, deren Titer wenigstens fünfzehnmal niedriger war als der Titer der Kontrolle ohne Mutagene, wurden zur Selektion der Mutanten verwendet.

L- Zellen- Monolayer auf Plastik- Petrischälchen (60 mm Ø) wurden bei einer Temperatur von 34° C (37°C) mit Virus, das, wie im Abschnitt zuvor dargelegt, mit mutagenen Substanzen behandelt worden war, infiziert und mit einem Agar- Overlay bedeckt.

Die Verdünnungsstufen wurden so gewählt, daß pro Petrischälchen nicht mehr als 30 gut voneinander abgrenzbare Plaques entstanden. Nach ca. 36 Stunden waren die einzelnen Plaques auch ohne Färbung bei Betrachtung gegen indirektes, diffuses Licht gut sichtbar.(29) Ihre Lokalisation und insbesondere ihre Größe (Durchmesser) wurden auf dem Petrischälchen markiert. Anschließend wurden die Kulturen weitere zwölf Stunden auf 39°C inkubiert.

Diejenigen Plaques, die während dieser zweiten Inkubationsperiode nicht mehr an Größe zunahmen, wurden mit einer Pasteur - Pipette gestochen und in 1 ml MEM 5 % FKS suspendiert.

Das auf diese Weise geerntete Virus wurde als potentielle ts-Mutante, die sich auf 39°C nicht mehr vermehrt, betrachtet.

Die Virussuspensionen wurden einmal gefroren und aufgetaut. Anschließend wurden je Probe zwei mit L- Zellen bewachsene Petrischälchen (Ø 30 mm) infiziert, von denen eine Kultur auf 34°C (37°C), die andere auf 39°C inkubiert wurde.

Kulturen, die bei 34°C (37°C) deutliche Synzytia verursachten, bei 39°C dagegen nicht, wurden geerntet. Im Mikroplatten-Test wurde sowohl auf 34°C (37°C) als auch auf 39°C der Titer dieser Kulturen ermittelt.

Zu weiteren Versuchen wurden nur ts- Mutanten verwendet, deren Titer bei 34°C (37°C) zumindest eine Zehnerpotenz größer war als bei 39°C.

Um genetisch möglichst reine Stämme zu erhalten, wurde jede einzelne Mutante nach ihrer Isolierung noch dreimal durch Plaque - Passagen kloniert.

Schließlich erfolgte die Vermehrung der Mutanten wie im Absatz Virusvermehrung beschrieben. Anstelle der L- Zellen wurden hier jedoch Sac- Zellen benutzt, bei denen im Gegensatz zu L- Zellen keine Induktion endogener C- Typ- Viren erfolgt, wenn sie mit JHM- Virus infiziert sind. Da im Anfangsstadium der Arbeit noch keine Sac- Zellen verfügbar waren, wurden für die Versuchsschritte, die vor der Vermehrung der Mutanten stattfanden, L- Zellen verwendet.

Temperaturinaktivierung

In einem auf 39°C (bzw. 34°C) erwärmten Wasserbad wurden Virussuspensionen in gut verschlossenen Reagenzgläschen inkubiert. Zu bestimmten Zeitpunkten wurden Proben entnommen, in einem Trockeneis-Methanol-Bad schockgefroren und bis zur Titrierung im Mikroplatten-Test bei -70°C gelagert.

Komplementierung

Sac- Zellen- Monolayer auf 30 mm- Petrischälchen wurden sowohl mit zwei Mutanten gleichzeitig, als auch im gleichen Versuchsansatz mit jeder Mutante einzeln infiziert. Die Multiplizität lag jeweils zwischen 0,2 und 1 PFU/Zelle.

Nach einer Stunde Adsorptionszeit auf 4°C wurde das nicht adsorbierte Virus abgesaugt, die Plättchen einmal sorgfältig mit MEM gewaschen und etwa drei Milliliter vorgewärmtes MEM 5 % FKS pro Plättchen zugegeben. Die Inkubation erfolgte im CO_2-Inkubator bei 39°C.

Als die Kontrolle des Wildtyp- Virus bereits nach zwölf Stunden einen deutlichen CPE aufwies, wurden die Kulturen einmal gefroren und aufgetaut und anschließend der Virustiter im Mikroplatten-Test bei 34°C und auch bei 39°C bestimmt.

Der Komplementierungsindex für zwei Mutanten x und y wurde nach der Formel von Fields und Joklik (9) berechnet:

$$\frac{(\text{Virus x + Virus y})\text{titriert auf } 34^{\circ}\text{C} - (\text{V.x.+V.y.})\text{t.}39^{\circ}\text{C}}{(\text{Virus x})\text{titriert auf } 34^{\circ}\text{C} + (\text{Virus y})\text{titriert auf } 34^{\circ}\text{C}}$$

Ist der Virustiter der gemischten Infektion anderthalb bis zweimal größer als die Summe der Titer der beiden einzelnen Mutanten, so wird die Komplementierung als positiv und statistisch signifikant betrachtet.(12)

RNA-Synthese

Sac- Zellen (auf Petrischälchen 30 mm Ø) wurden mit den verschiedenen Mutanten mit der größtmöglichen Multiplizität, die auf Grund des nicht besonders hohen Titers der Mutanten unter 1 PFU/Zelle lag, infiziert und bei 34°C und 39°C inkubiert. In unterschiedlichen Zeitabständen wurde das Wachstumsmedium abgesaugt und pro Petrischälchen 1,5 ml vorgewärmtes MEM 5 % FKS, das zusätzlich 5 µg/ml Actinomycin D enthielt, zugesetzt. Nach 20 Minuten wurden 0,5 ml ebenfalls gewärmtes MEM 5 % FKS mit ^{3}H-Uridin (5 µCi/Plättchen) auf den Zellrasen pipettiert. Die radioaktiv markierten Kulturen wurden weitere 30 Minuten auf 34°C, bzw. 39°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen einmal mit eiskaltem PBS (phosphate buffered saline) gewaschen, mit einem Gummiwischer vom Plastikschälchen abgekratzt, in ein Zentrifugenröhrchen gebracht, und dieses, nachdem es mit PBS aufgefüllt wurde, ca. 5 Minuten (bei 1500 rpm) zentrifugiert. Das Pellet löste sich in 1 ml 2%igem SDS (Natriumdodecylsulfat) auf 37°C nach etwa 10 Minuten. Hierzu wurden nun 10 ml 10%ige Trichloressigsäure (TCA) gegeben. Diese Probe wurde auf einem Whatman GFC Glasfilter (2,5 cm) filtriert. Nachdem das Filterpapier binnen einer Stunde bei 80°C getrocknet war, wurde es mit ca. 8 ml Szintillationsflüssigkeit PPO/POPOP (gelöst in Toluol) in ein Szintillationsfläschchen gebracht.

Die Anzahl der radioaktiven Impulse (Counts), entsprechend der stattgefundenen Synthese viraler RNA, wurde im Szintillationszähler (Packard) bestimmt.

Tierversuch

Für die Experimente wurden spezifisch pathogenfreie, säugende und 20-25 Tage alte Ratten (Stamm CHBB/THOM, Thomae, Biberach) benutzt. Die Seren der Tiere enthielten keine neutralisierenden Antikörper gegen Coronaviren.

Das Virus wurde in die linke Gehirnhemisphäre der Ratten inokuliert. Neugeborene erhielten 0,01 ml, 20-25 Tage alte Ratten 0,03 ml der gewünschten Virussuspension.

Um das Virus aus den infizierten Tieren wieder zu isolieren, wurden diese unter aseptischen Bedingungen seziert. Die entnommenen Gewebe (Gehirn und Rückenmark) wurden mehrmals mit kaltem PBS, das auch Antibiotika enthielt, gewaschen und danach in einem Glasdouncer zu einer 15%igen (w/v) Suspension homogenisiert. Diese Suspension adsorbierte eine Stunde auf L- Zellen- Monolayer (0,3 ml/Petrischälchen Ø 60 mm). Anschließend wurden die Monolayer gewaschen und mit 5 ml MEM 5 % FKS + Antibiotika überschichtet. Kulturen, die nach 48 Stunden noch keinen CPE aufwiesen, wurden noch zweimal passagiert, bevor ein negatives Ergebnis akzeptiert wurde.(28)

E R G E B N I S S E

Wachstumskurven des Wildtyp- Virus

Zur Bestimmung der Replikation des Wildtyp- Virus wurden Monolayerkulturen von L- Zellen infiziert und bei 37°C bzw. 39°C inkubiert.

Eine Stunde p.i.(post infectionem) wurde das nicht adsorbierte Virus entfernt, die Zellen einmal mit MEM gewaschen und mit angewärmtem Medium überschichtet. Proben wurden zu den jeweiligen Zeitpunkten entnommen und im Mikroplatten-Test auf infektiöses Virus untersucht (Titer ausgedrückt als ID_{50}).

Die Wachstumskurven des Wildtyps sind in Figur 1 aufgezeichnet, die exakten Zahlenwerte in Tabelle 1 dargestellt. Die endgültige Virusausbeute war bei beiden Temperaturen ungefähr gleich groß. Verglichen mit der Replikation auf 37°C war die Virusvermehrung auf 39°C deutlich beschleunigt; die Eklipse war einige Stunden früher beendet und auch die maximale Ausbeute eher erreicht.

Einfluß der Virusadsorptionszeit beim Plaquetest

Die Versuchsgrundlage bildete ein Plaquetest auf L- Zellen, dessen Variable die Adsorptionszeit darstellte. Das Ergebnis ist Tabelle 2 zu entnehmen.

Es bleibt festzustellen, daß bei Verlängerung der Adsorptionszeit um mehr als das Zehnfache die Virusausbeute nicht einmal verdoppelt ist.

Mutagenese in vitro mit $NaNO_2$

Das Wildtyp- Virus wurde bei verschiedenen pH- Werten mit Natriumnitrit behandelt. Die Resultate sind Tabelle 3 und Figur 2 zu entnehmen; das nicht inaktivierte Virus ist als Funktion der Zeit dargestellt.

Deutlich zu erkennen ist die exponentielle Rate der Inaktivierung, die mit steigender H-Ionen-Konzentration zunimmt. Bei pH 4 waren keine brauchbaren Werte mehr zu erhalten, da im Mikroplatten-Test die L- Zellen stark geschädigt wurden.

Wie die Kontrolle mit NaCl anstelle von $NaNO_2$ eindeutig zeigt, ist für den überwiegenden Teil des Verlusts an Infektiosität $NaNO_2$ verantwortlich. Wird $NaNO_2$ durch NaCl ersetzt, ist die Zahl der inaktivierten Virionen merklich herabgesetzt.

Mutagenese in vitro mit Hydroxylamin

Hydroxylamin wurde in verschiedenen Verdünnungen mit dem Wildtyp- Virus versetzt. Die von Ensinger (7) für die Mutagenese von Adenovirus Typ 5 angegebene 2 molare Konzentration erwies sich als zu toxisch für die benutzten Zellsysteme. Erst bei einer 0,1 m Hydroxylaminlösung ist ein exponentieller Abfall der Infektiosität deutlich sichtbar (s.Tabelle 4; Figur 3);nach achtstündiger Einwirkung von HA ist das Wildtyp-Virus soweit inaktiviert, daß der Titer um mehr als das Hundertfache sinkt.
Die Kontrolle mit NaCl beweist, daß der Verlust an Infektiosität großenteils an der Inaktivierung durch HA liegt. Es darf aber nicht übersehen werden, daß auch im Kontrollansatz der Virustiter nach 20 Stunden ca. eine Zehnerpotenz tiefer liegt als zu Beginn;

eine Tatsache, die auf die Inaktivierung des Virus bei Zimmertemperatur zurückgeführt werden kann.

Mutagenese in vivo mit 5- Fluoruracil (bzw. Brom-desoxyuridin)

Die Konzentration von 1 millimolarem 5- Fluoruracil im Wachstumsmedium läßt die Virusausbeute um mehr als das Tausendfache absinken, verglichen mit Virus, das mit mutagenfreiem Medium vermehrt wurde. Steigert man die Konzentration auf 10 millimolar, so liegt der Virustiter gar um vier Zehnerpotenzen niedriger.

Bromdesoxyuridin, das von Williams (45) als Mutagen für Adenovirus Typ 5 beschrieben ist, zeigt im Gegensatz zum Fluoruracil keine Inaktivierung des Virus; es beeinträchtigt die Vermehrung des JHM-Virus nicht und ist für die Isolierung von Mutanten unbrauchbar. Dieses Ergebnis steht in Übereinstimmung mit McIntosh.(25)

Die erhaltenen Resultate sind Tabelle 5 zu entnehmen.

Selektion der Mutanten

Zur Isolierung der Mutanten kamen nur die mit Mutagenen behandelten Virusstämme zur Verwendung, deren Titer wenigstens fünfzehnmal niedriger war als der Titer der Kontrolle ohne Mutagene.

Von den insgesamt 709 gestochenen Plaques lieferten ca. 90 % infektiöses Virus. 139 der 709 Klone wurden mit Natriumnitrit, 106 mit Hydroxylamin und 464 mit 5- Fluoruracil behandelt. Diese letztgenannten 464 gestochenen Plaques müssen weiterhin unterteilt werden; für die erste Gruppe, die 270 Klone umfaßt, galten dieselben Bedingungen wie für die mit $NaNO_2$ und HA behandelten Virusstämme: die permissive Temperatur betrug 37°C, die nicht-permissive Temperatur, bei der sich die Mutanten nicht mehr vermehren sollten, 39°C. In der Gruppe der restlichen 194 Klone wurde die permissive Temperatur auf 34°C gesenkt, in der Hoffnung, daß durch eine Vergrößerung der Temperaturdifferenz von 2°C auf 5°C die Ausbeute an Mutanten verbessert werden könnte.

Diejenigen Klone, die eine signifikante Reduktion der Anzahl der Plaques auf 39°C, verglichen mit derjenigen auf 34(37)°C zeigten, konnten als ts-Mutanten bezeichnet werden. Es waren dies vorerst 34 Mutanten (entspricht 4,8 % der insgesamt gestochenen Plaques), die bei 39°C eine zumindest zehnfach geringere Ausbeute an infektiösem Virus aufwiesen als bei der permissiven Temperatur.

Von diesen 34 Mutanten resultierten 4 aus der Mutagenese mit $NaNO_2$ (= 2,9%), 2 aus der Mutagenese mit Hydroxylamin (=1,9%), 10 aus der Mutagenese mit 5- FU bei 37°C (=3,7%) und 18 aus der Mutagenese mit 5- FU bei 34°C (=9,3%).

Tabelle 6 zeigt, durch welches Mutagen die einzelnen Mutanten entstanden. Weiterhin ist die jeweilige Reversionshäufigkeit (reversion frequency) angegeben, die als Verhältnis des Titers der nicht-permissiven Temperatur zum Titer der permissiven Temperatur definiert ist: $\frac{\text{Titer } 39^{\circ}C}{\text{Titer } 34(37)^{\circ}C}$.

(Je kleiner der Wert, desto "stabiler" die Mutante).

Da zur Charakterisierung der Mutanten genetisch möglichst reine Stämme benötigt wurden, mußten diese 34 Mutanten weiter geklont werden, was mit Hilfe einer dreimaligen Plaquereinigung geschah. Danach offenbarten nur noch zwölf der ursprünglich 34 Mutanten ihre temperatur-sensitiven Eigenschaften (entspricht 35,5 %). Beachtenswert ist, daß von den elf Mutanten, die in Tabelle 6 eine geringere Reversionshäufigkeit als 1×10^{-2} aufwiesen, auch nach der Plaquereinigung noch sechs (entspricht 54,3 %) den temperatur-sensitiven Phänotyp zeigten.

Die Gesamtfrequenz der genetisch brauchbaren Mutanten betrug 1,7 %. Nach einzelnen Mutagenen aufgeschlüsselt ergibt sich folgendes Bild:

2 Mutanten mit $NaNO_2$	(entspricht 1,4%)
O Mutanten mit HA	
5 Mutanten mit 5-FU $37^{\circ}C$	(entspricht 1,9%)
5 Mutanten mit 5-FU $34^{\circ}C$	(entspricht 2,6%)

Vergleiche mit der spontanen Mutationsrate können nicht gezogen werden, da das Wildtyp- Virus in dieser Hinsicht nicht näher untersucht wurde.

Da gewisse Schwierigkeiten bestanden, große Mengen an Virus mit möglichst hohem Titer, die für die Komplementierungsversuche und Untersuchungen der RNA-Synthese erforderlich waren, zu erhalten, war es nötig, mehrere Virusvermehrungen in Folge durchzuführen. Nach jeder einzelnen Passage wurde der Titer im Mikroplatten-Test bei 39°C und 34°C ermittelt. Hierdurch war unschwer zu ersehen, ob die verschiedenen Mutanten stabil waren oder ob sie zum Wildtyp revertierten, d.h. ihre temperatur--sensitiven Eigenschaften verloren. Das Ergebnis spiegelt Tabelle 7 wider.

Die Reversionsfrequenz variiert von Passage zu Passage nicht unbeträchtlich. In einem Fall nimmt sie sogar bis 1×10^{-1} zu (Mut.Nr.1,Passage 2), um sich in der folgenden Passage mit 1×10^{-2} wieder im "erwarteten Rahmen zu bewegen". Bei der 5. Passage von Mutante Nr. 31 steigt die Reversionsfrequenz ebenfalls stark an, sodaß mit der Möglichkeit gerechnet werden muß, daß die Mutanten ihre ts-Eigenschaften verlieren.

Die "guten" Mutanten, die alle eine Reversionshäufigkeit von weniger als 3×10^{-3} haben, zeigen im Gegensatz zu den oben genannten Beispielen ein sehr konstantes Verhalten; sie erweisen sich zum Teil über neun Passagen als sehr stabil.

Temperaturinaktivierung

Dieser Versuch ist geeignet, um zwischen Defekten der Strukturproteine des Virions und einer Läsion der nichtstrukturellen Proteine (z.B. virusinduzierte Enzyme) zu unterscheiden.(20) Eine ts- Mutation, die eine strukturelle Komponente des Virions betrifft, kann mit einer erhöhten Thermolabilität des mutierten Virus einhergehen;(3) bei einer Mutation der nichtstrukturellen Proteine wäre dies nicht zu erwarten.

Die Temperaturinaktivierung der einzelnen Mutanten wurde auf 34°C und auf 39°C bestimmt und mit dem Verhalten des Wildtyps verglichen.

Um die graphische Darstellung übersichtlicher zu gestalten, wurde der Anteil des nicht inaktivierten Virus in Prozenten des Ausgangstiters angegeben. (s.Figur 4)

Wie aus der Abbildung zu entnehmen ist, erweisen sich die Mutanten bei 39°C ausnahmslos hitzelabiler als das Wildtyp-Virus. Aber auch innerhalb der Mutanten sind beträchtliche Unterschiede festzustellen. So werden die Mutanten Nr.1o,16,24 und 41 besonders schnell inaktiviert; sie weisen nach einer Zeitdauer von vier Stunden nur noch weniger als 3 ‰ (Promille) "Überlebende" auf, im Gegensatz zum Wildtyp mit knapp 2O % zur gleichen Zeit. Auffallend ist weiterhin, daß Mutante Nr. 18 weit weniger hitzelabil als alle anderen Mutanten ist (noch 5 % Überlebende nach vier Stunden).

Zeigen sich die Mutanten bei der Temperaturinaktivierung auf 39°C deutlich weniger temperaturresistent als das Wildtyp-Virus, so sind beim entsprechenden Versuch auf 34°C keine auffallenden Unterschiede zum Wildtyp festzustellen. Die einzige Ausnahme bildet Mutante Nr. 16, die doch erheblich hitzelabiler als alle anderen unter-

suchten Mutanten ist. Sie zeigt nach vier Stunden nur mehr als 1 % "Überlebende"; dieser Wert beträgt beim Wildtyp und den restlichen Mutanten ca. 10 %.

RNA-Synthese

Die Fähigkeit der Mutanten, die RNA-Synthese zu induzieren, wurde durch die Markierung infizierter Kulturen mit ^{3}H-Uridin untersucht. Um nur die virusspezifische RNA-Synthese nachzuweisen, ist es nötig, die RNA-Synthese der Wirtszelle auszuschalten. Dies wird durch Behandlung mit Actinomycin D erreicht.(6)

Die Ergebnisse des Versuchs sind in Figur 5 dargestellt.

Bei 34°C verursachen die Mutanten eine Inkorporation von radioaktiv markiertem ^{3}H-Uridin in virale RNA, die sich nicht signifikant von den Ergebnissen beim Wildtyp unterscheidet. Dieses Resultat ist nicht verwunderlich, denn definitionsgemäß müssen die Mutanten bei der permissiven Temperatur infektiöses Virus produzieren. Die Mutanten Nr.10 und 43 lassen keine RNA-Synthese erkennen, was aber daran liegt, daß der Titer dieser Mutanten besonders niedrig war und wohl nicht ausreichte, um bereits nach zwölf Stunden reife Virionen in genügender Anzahl zu liefern.

Bei 39°C weisen außer dem Wildtyp-Virus noch die Mutanten Nr.1,22 und 24 eine nachweisbare RNA-Synthese auf. Im Falle aller anderen Mutanten ist die Rate des Einbaus an ^{3}H-Uridin nicht größer als die radioaktive Inkorporation in nicht infizierte mit Actinomycin D behandelte Zellen, die als Kontrolle dienten. Diese Mutanten, die bei der nicht-permissiven Temperatur keine RNA und kein infektiöses Virus synthetisieren, werden als RNA-negativ, im Sinne der Definition von Burge und Pfefferkorn, bezeichnet.(6)

Beide Autoren nennen diejenigen Mutanten dagegen RNA-positiv, die zwar RNA, aber kein infektiöses Virus, bilden.
Dieser Gruppe sind keine Mutanten zuzuordnen, da die RNA-synthetisierenden Mutanten Nr.1,22 und 24 einen deutlichen, wenn auch nur geringfügigen CPE verursachen, also infektiöses Virus produzieren.
Ihre RNA-Synthese ist mit Sicherheit auf die Anwesenheit von Revertanten zurückzuführen, da ihre Reversionsfrequenz verglichen mit derjenigen der anderen Mutanten wesentlich höher liegt.

Komplementierung

Diese Versuche wurden durchgeführt um zu erkennen, ob die einzelnen Mutanten Mutationen im gleichen oder in verschiedenen Genen enthalten.(14) Es wurden Sac-Zellen gleichzeitig mit zwei Mutanten infiziert und bei der nicht-permissiven Temperatur inkubiert.

Liegt die Läsion nun bei beiden Mutanten im gleichen Cistron, so wird kein infektiöses Virus gebildet; sind dagegen von dem Defekt verschiedene Cistrone betroffen, so ergänzen sich die Mutanten gegenseitig: Mutante A kann die Läsion, die Mutante B aufweist kompensieren und umgekehrt. Folge ist die Produktion von infektiösem Virus auch unter nicht-permissiven Bedingungen.

Eine erfolgreiche Komplementierung setzt voraus, daß beide Mutanten in derselben Zelle in nächster Nähe sind, um die Interaktion der Genprodukte zu erleichtern.(16) Deshalb sollte bei der Infektion der Zellen mit dem Virus die Multiplizität möglichst hoch liegen. Bedingt durch den nicht sehr hohen Titer der Mutanten waren bei den Komplementierungsversuchen jedoch nur

Werte von 0,2-1 PFU/Zelle erreichbar, also keinesfalls optimale Voraussetzungen gegeben.

Als Adsorptionstemperatur wurde $4^{o}C$ gewählt. Dies sollte einen gleichzeitigen Beginn der Replikation gewährleisten und es sollte verhindert werden, daß schon während der Adsorption die Virusvermehrung beginnt, wie dies bei Temperaturen um $37^{o}C$ der Fall ist.

In Vorversuchen, in denen auch die Mutanten mit relativ hoher Reversionsfrequenz benutzt wurden, lag der Komplementierungsindex der Kombinationen dieser Mutanten teilweise über 1; es hatte also offensichtlich eine Komplementierung stattgefunden. Diese Ergebnisse ließen sich in weiteren Versuchen jedoch nicht reproduzieren. So wurden die endgültigen Experimente nur mit den Mutanten durchgeführt, die bei der nicht-permissiven Temperatur mit Sicherheit keinen CPE zeigten und die zudem eine sehr niedrige Reversionshäufigkeit (weniger als 2×10^{-4}) hatten. Dies waren die Mutanten Nr. 16,18,31,33,36,41,42 und 43. Alle möglichen Kombinationen dieser Mutanten rufen bei $39^{o}C$ keinen cytopathischen Effekt hervor, sie liefern kein infektiöses Virus - es findet folglich keine Komplementierung statt.

Vorläufige Resultate tierexperimenteller Untersuchungen

Mit den Mutanten ts 1, ts 16, ts 33, ts 42 und ts 43 wurden bereits Tierexperimente begonnen, die jedoch erst im Anfangsstadium stehen. Das ursprünglich verwendete unklonierte, nur in Saugmäusen vermehrte Wildtyp- Virus verursacht bei intracerebraler Infektion zwanzig Tage alter Ratten fast nie eine akute Panenzephalitis (APE), nur in wenigen Fällen eine subakute demyelinisierende Enzephalomyelitis (SDE) und äußerst selten eine demyelinisierende Enzephalomyelitis mit langer Inkubationszeit (LDE).

Das klonierte, zelladaptierte Wildtyp- Virus (wt-Zellklon) hingegen bewirkt eine hohe Rate an APE, aber noch seltener als der ungeklonte Wildtyp eine SDE. Dieser Stamm (wt-Zellklon) diente auch als Ausgangsmaterial für die Induktion von temperatursensitiven Mutanten und für biochemische Untersuchungen.

Alle untersuchten Mutanten vermehrten sich in Saugmäusen ähnlich wie das Wildtyp- Virus. In zwanzig Tage alten Ratten hingegen werden nach Infektion mit ts 1, ts 42 und ts 43 ausschließlich Erkrankungen in Form einer SDE und LDE beobachtet. Die Rückisolate aus den Gehirnen und dem Rückenmark der erkrankten Tiere sind zum Teil nicht mehr temperatur-sensitiv. Dennoch scheint es sich dabei nicht um eine Selektion von Revertanten in vivo zu handeln. Untersuchungen mit dem Rückisolat einer nach Infektion mit ts 42 erkrankten Ratte (Inkubationszeit 3 Monate) ergaben eine hohe Erkrankungsrate an SDE.

In Figur 6 sind die Überlebenskurven von je 45 Ratten dargestellt, die im Alter von 20 Tagen intracerebral mit jeweils 4×10^3 ID 50/Tier Wildtyp- Virus (Zell-

klon) einerseits und in einer zweiten Gruppe mit der gleichen Dosis ts 42 - Isolat 1027 infiziert wurden. Während die meisten der mit dem Wildtyp infizierten Tiere innerhalb von zehn Tagen erkrankten und starben, zeigten die mit ts 42-Isolat 1027 infizierten Tiere einen deutlich verzögerten Verlauf der Erkrankung.

Die Ergebnisse der neuropathologischen Untersuchungen von K.Nagashima sind in Tabelle 8 zusammengefaßt. Mit dem Wildtyp Zellklon infizierte Ratten erkrankten zu etwa 65 % an einer APE, während 36 % der mit ts 42-Isolat 1027 infizierten Tiere die klinischen und neuropathologischen Veränderungen einer SDE aufwiesen. In diesem Experiment wurden auch die nicht erkrankten Tiere 24 Tage p.i.(post infectionem) getötet. Ein hoher Prozentsatz dieser klinisch unauffälligen Ratten zeigte ebenfalls Zeichen einer Demyelinisierung.

D I S K U S S I O N

Spontane Mutationen im Sinne einer ts- Mutante kommen bei den meisten Virusstämmen wahrscheinlich nur selten vor, bei einigen Viruspopulationen sind sie jedoch in geringer Häufigkeit zu beobachten. (Reovirus, Influenza, MKS-Virus, Newcastle-Virus).(30) Mutationen können aber durch Mutagene wie Röntgenstrahlen, UV-Licht, Natriumnitrit, Hydroxylamin und alkylierende Substanzen verursacht werden.(24)

Diese Methode macht man sich zunutze, um die Isolierung von ts- Mutanten zu vereinfachen. So führt die Vermehrung eines Virus in Anwesenheit eines Mutagens zwar zu einer Virusproduktion mit verminderter Infektiosität, jedoch auch zu einem erhöhten Anteil an Mutanten.(34)

Die drei für die Mutagenese herangezogenen chemischen Substanzen haben unterschiedliche Angriffspunkte auf die Virusreplikation, sodaß die Wahrscheinlichkeit, verschiedenartige Mutanten zu erhalten, relativ groß ist. $NaNO_2$, das Granoff schon 1961 (13) zur Mutagenese von Newcastle- Virus benutzte, wirkt, indem es die Basen der Nukleotide desaminiert; Hydroxylamin hingegen wandelt Cytosin in Uracil um;(24) und 5-Fluoruracil ist ein Antimetabolit, der auf Grund seiner höheren Affinität zu Enzymen des Nukleinsäurenbasen-Stoffwechsels das natürliche Substrat verdrängt. Dadurch wird entweder der in der Phase der Nukleinsäuresynthese besonders hohe Bedarf an Nukleotiden nicht gedeckt oder aber es wird das falsche Substrat eingebaut.(11)

Temperatur-sensitive Mutanten sind ein wichtiges Hilfsmittel um die komplexe Wechselwirkung viraler Genprodukte mit den Wirtszellen bei der Entstehung bestimmter Krankheitsbilder zu analysieren. Das Coronavirus kann in Ratten neuropathologische Veränderungen verursachen, die wesentliche Analogien zu noch wenig verstandenen Entmarkungserkrankungen des Zentralnervensystems von Mensch und Tier aufweisen. Weiterführende Experimente mit diesem Versuchstiermodell setzen die Anwendung biochemisch definierbarer Virusklone voraus, die sowohl eine höhere Krankheitsrate als auch unterschiedliche Krankheitsverläufe induzieren. Die zwölf isolierten temperatur-sensitiven Mutanten des JHM-Virus erwiesen sich bei ihrer Vermehrung über mehrere Passagen als stabil und eignen sich deshalb für biochemische und genetische Experimente. Auf Grund der bisher durchgeführten Versuche konnte noch nicht festgestellt werden, ob die Mutanten einzelne oder multiple Mutationen enthalten.

Wie aus Tabelle 6 hervorgeht, wurde der größte Prozentsatz an Mutanten durch die Mutagenese mit 5-Fluoruracil erzielt. Erfolglos blieb dagegen der Versuch mit Hydroxylamin als Mutagen. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, daß der Titer des mit Hydroxylamin behandelten Virusstammes, der zur Isolierung der Mutanten benutzt wurde, nur fünfzehnmal niedriger war als der Titer des Kontrollvirus. Bei der Mutagenese mit 5-Fluoruracil betrug die Differenz der Titer jedoch mehr als das Tausendfache.

Beachtenswert ist weiterhin, daß durch Senken der permissiven Temperatur von 37°C auf 34°C die Ausbeute an Mutanten beträchtlich gesteigert werden konnte.

So erwiesen sich bei einer Differenz von 2°C zwischen permissiver und nicht-permissiver Temperatur nur 1,9 % der insgesamt gestochenen Plaques als Mutanten; bei Erhöhung des Temperaturunterschiedes auf 5°C stieg der Anteil der Mutanten auf immerhin 2,6 %.
Die Komplementierungsversuche führten zu keinem positiven Ergebnis; es ließ sich keine Komplementierung nachweisen, was dafür spricht, daß entweder genetisch identische Mutanten oder multiple Mutationen vorliegen.(39) Es muß hierzu betont werden, daß sich durch den relativ niedrigen Titer der Mutanten eine Komplementierung mit den üblichen Standardmethoden schwer verifizieren läßt, wie auch andere Untersucher bestätigen.
So inkubierte beispielsweise Bergholz (3) seine infizierten Zellkulturen fünf Stunden lang bei der permissiven Temperatur, bevor er den Versuch auf 39°C ausführte, während Haspel (16) die Mutanten mit Poly-L-Ornithin behandelte um eine Komplementierung aufzeigen zu können.(14)

Für die genetische Identität der Mutanten spricht neben der negativen Komplementierung auch die Tatsache, daß alle Mutanten RNA-negativ sind und daß zehn der zwölf Mutanten der Mutagenese mit 5-Fluoruracil entstammen. Ein gewichtiges Argument gegen die Identität der Mutanten ist ihr unterschiedliches Verhalten bei den Versuchen der Temperaturinaktivierung. Dies könnte darauf hindeuten, daß entweder verschiedene einzelne Mutationen innerhalb eines Gens oder aber doppelte intra- oder intercistronische Mutationen vorliegen.(3)

Bei der Temperaturinaktivierung auf 39°C zeigten sich die Mutanten ohne Ausnahme hitzelabiler als der Wildtyp - ein Zeichen, daß durch die Mutation eine strukturelle Komponente des Virus beeinflußt oder direkt betrof-

fen wird.

Die bisher vorliegenden Resultate der Tierexperimente weisen darauf hin, daß sowohl der Erkrankungstyp als auch die Erkrankungsrate durch Auswahl geeigneter Virusklone gesteuert werden kann.(s.Tabelle 9) Das ursprüngliche, ungeklonte Wildtyp- Virus besteht wahrscheinlich aus einer genetisch uneinheitlichen, heterologen Viruspopulation. Durch Zellpassagen und Klonierung wurde aus dem Ausgangsmaterial eine wesentlich virulentere Viruspopulation selektioniert, die sich in Gewebekultur zu hohen Titern vermehren läßt und daher zur Untersuchung von Struktur und Replikation geeignet ist. Im Tierversuch hingegen verursachte dieses zellkultur-adaptierte Virus nahezu ausschließlich das Krankheitsbild einer akuten Panenzephalitis (APE). Es ließen sich jedoch, ausgehend von diesem Virusklon nach Induktion Mutanten isolieren, die praktisch keine APE sondern eine hohe Rate an SDE und LDE verursachten. Wie die Untersuchungen mit dem Rückisolat 1027 von ts 42 zeigten, muß dabei die Temperatursensitivität nicht erhalten bleiben. Dies deutet darauf hin, daß die Mutante mehrere Läsionen im Genom enthält, die im Tier weiter selektioniert werden. Neurovirulenz und Temperatursensitivität können miteinander korreliert sein, aber eine solche Korrelation ist nicht immer vorhanden. Dies wurde beispielsweise auch für ts- Mutanten von Vesicular-Stomatitis-Virus (VSV) nachgewiesen.(32,37)

In dem molekularbiologisch und genetisch sehr genau analysierten Reovirussystem (43) konnte kürzlich die Existenz von "Suppressor-Mutanten" nachgewiesen werden.(33) Solche Mutanten verhalten sich in bezug auf den ts- marker wie eine Revertante, ergeben im Tierversuch aber dennoch das durch die ursprüngliche

ts-Mutante erzeugte Krankheitsbild. Durch Rekombinationsexperimente wurde nachgewiesen, daß diese Suppressormutanten im Genom tatsächlich mehrere, vom ts-marker unabhängige Läsionen enthalten.

Die Sammlung der temperatur-sensitiven Mutanten, die als Resultat dieser Arbeit entstanden, bildet eine wesentliche Grundlage für weitere Untersuchungen, die sowohl die Genetik und Biochemie der Coronaviren als auch die Pathogenese demyelinisierender Erkrankungen im Tiermodell umfassen.

Tabelle 1: Wachstumskurven des wt- Virus

	0^h	2^h	4^h	6^h	8^h
ID 50 37°C	$3,2x10^3$	$3,6x10^3$	$2,8x10^3$	$3,1x10^3$	$1,2x10^3$
39°C	$3,2x10^3$	$2,7x10^3$	$4,0x10^3$	$5,8x10^2$	$1,2x10^4$

	10^h	12^h
ID 50 37°C	$5,8x10^2$	$5,8x10^3$
39°C	$3,6x10^4$	$2,5x10^5$

Tabelle 2: Einfluß der Virusadsorptionszeit beim Plaquetest

Adsorptionszeit:	Virustiter (ID 50)
10 min	$4,7x10^5$
30 min	$5,3x10^5$
60 min	$6,3x10^5$
120 min	$7,0x10^5$

Tabelle 3: Inaktivierung durch $NaNO_2$ (in vitro)
(Virustiter angegeben als ID_{50})

		$NaNO_2$	NaCl (als Kontrolle)
pH 4	0 min	$2,7 \cdot 10^3$	$2,5 \cdot 10^5$
	4 min	--	$2,0 \cdot 10^5$
	12 min	--	$1,0 \cdot 10^5$
pH 5	0 min	$1,4 \cdot 10^5$	$2,8 \cdot 10^5$
	2 min	$3,1 \cdot 10^4$	$2,3 \cdot 10^5$
	4 min	$2,7 \cdot 10^3$	$8,5 \cdot 10^4$
	6 min	--	$1,6 \cdot 10^5$
	8 min	--	$1,3 \cdot 10^5$
	12 min	$1,6 \cdot 10^3$	$2,4 \cdot 10^5$
pH 5,5	0 min	$4,7 \cdot 10^5$	$4,1 \cdot 10^5$
	2 min	$6,0 \cdot 10^4$	$3,9 \cdot 10^5$
	4 min	$3,2 \cdot 10^4$	$3,9 \cdot 10^5$
	6 min	$2,6 \cdot 10^4$	$5,0 \cdot 10^5$
	8 min	$6,5 \cdot 10^3$	$5,0 \cdot 10^5$
	12 min	$3,6 \cdot 10^3$	$3,5 \cdot 10^5$
pH 6	0 min	$3,6 \cdot 10^5$	$1,4 \cdot 10^5$
	4 min	$1,4 \cdot 10^5$	$7,0 \cdot 10^4$
	8 min	$8,7 \cdot 10^4$	$3,1 \cdot 10^5$
	12 min	$7,5 \cdot 10^4$	$2,2 \cdot 10^5$
	16 min	$3,6 \cdot 10^4$	$3,4 \cdot 10^5$

Tabelle 4: Inaktivierung durch Hydroxylamin (in vitro)
(Virustiter angegeben als ID 50)

	0,1 m HA	0,5 m HA	NaCl (als Kontrolle)
0 h	$5,6 \cdot 10^4$	$8,3 \cdot 10^4$	$8,7 \cdot 10^4$
1/2 h	$3,2 \cdot 10^4$	$1,2 \cdot 10^3$	
1 h	$5,6 \cdot 10^3$		$1,8 \cdot 10^5$
2 h	$3,2 \cdot 10^3$		
4 h	$1,2 \cdot 10^3$		$3,2 \cdot 10^4$
8 h	$4,0 \cdot 10^2$		
24 h	--		$1,6 \cdot 10^4$

Tabelle 5: Inaktivierung durch 5-Fluoruracil und Bromdesoxyuridin (in vivo)

(Titer angegeben als ID 50)

	1 m M	5 m M	10 m M	Kontrolle (ohne 5-FU)
5-FU	$2,4 \cdot 10^2$	$2,0 \cdot 10^2$	$4,0 \cdot 10^1$	$4,4 \cdot 10^5$

	1 m M	5 m M	10 m M	Kontrolle (ohne BrdU)
BrdU	$3,5 \cdot 10^5$	$3,6 \cdot 10^5$	$1,0 \cdot 10^6$	$3,5 \cdot 10^5$

Tabelle 6: Reversionsfrequenz der vorläufigen Mutanten

	Mutagen	Rev.Frequenz
Mut Nr. 1	$NaNO_2$ pH 5,5 8 min	7,9 . 10-2
3	HA 0,1 mM 2^h	8,2 . 10-3
4	HA 0,1 mM 2^h	5,9 . 10-2
9	$NaNO_2$pH 5,5 8 min	1,6 . 10-2
10	$NaNO_2$pH 5,5 8 min	3,7 . 10-2
12	$NaNO_2$pH 5,5 12 min	4,0 . 10-2
15	5-FU 1 mM	2,5 . 10-3
16	5-FU 1 mM	6,4 . 10-3
18	5-FU 5 mM	8,2 . 10-3
19	5-FU 5 mM	9,6 . 10-2
21	5-FU 5 mM	2,8 . 10-2
22	5-FU 5 mM	6,5 . 10-2
24	5-FU 1 mM	1,5 . 10-2
27	5-FU 5 mM	1,8 . 10-2
28	5-FU 5 mM	4,2 . 10-2
31	5-FU 5 mM	2,0 . 10-3
33	5-FU 1 mM	2,0 . 10-2
34	5-FU 1 mM	7,6 . 10-2
35	5-FU 1 mM	3,2 . 10-2
36	5-FU 1 mM	6,8 . 10-3
37	5-FU 1 mM	3,7 . 10-2
38	5-FU 1 mM	2,3 . 10-2
39	5-FU 1 mM	5,1 . 10-2
40	5-FU 1 mM	1,9 . 10-2
41	5-FU 1 mM	7,9 . 10-3

zu Tabelle 6: Reversionsfrequenz der vorläufigen Mutanten

	Mutagen	Rev.Frequenz
Mut Nr. 42	5-FU 1 mM	8,2 . 10-3
43	5-FU 1 mM	1,2 . 10-2
45	5-FU 1 mM	4,0 . 10-2
46	5-FU 1 mM	5,1 . 10-2
47	5-FU 1 mM	2,9 . 10-2
48	5-FU 1 mM	1,2 . 10-3
49	5-FU 1 mM	1,2 . 10-2
52	5-FU 1 mM	2 . 10-3
53	5-FU 1 mM	8,7 . 10-3

Tabelle 7: Reversionsfrequenz der Mutanten

	1.Passage	2.Passage	3.Passage	4.Passage	5.Passage	6.Passage	7.Passage	8.Passage
Nr. 1	9,2.1o-3	1,o.1o-1	1,o.1o-2					
Nr. 10	1,4.1o-1	1,o.1o-1						
Nr. 16	1,o.1o-3	8,2.1o-4	2,o.1o-5					
Nr. 18	1,5.1o-4	5,1.1o-4	5,7.1o-5					
Nr. 22	1,5.1o-2	2,9.1o-2	1,5.1o-2					
Nr. 24	2,5.1o-2	7,3.1o-2	7,5.1o-3	4,7.1o-3	2,1.1o-3			
Nr. 31	3,o.1o-3	3,9.1o-3	6,8.1o-3	8,3.1o-3	1,o.1o-2	1,7.1o-4		
Nr. 33	2,o.1o-3	1,2.1o-3	6,8.1o-5	6,8.1o-5	5,1.1o-4	1,7.1o-5		
Nr. 36	8,2.1o-4	1,7.1o-3	2,o.1o-4					
Nr. 41	2,5.1o-3	1,2.1o-2	8,9.1o-4	2,4.1o-3	7,7.1o-4	2,5.1o-5		
Nr. 42	3,2.1o-3	8,6.1o-3	6,8.1o-4	1,2.1o-4	8,6.1o-5	6,8.1o-4	1,3.1o-5	
Nr. 43	8,6.1o-2	8,6.1o-3	--	--	3,2.1o-4	1,7.1o-4	7,9.1o-5	3,2.1o-5

Tabelle 8: Vergleich von wt-Zellklon mit ts 42--Isolat 1027

Häufigkeit der verschiedenen Erkrankungsformen

	akute Panenzephalitis	subakute demyelinisierende Enzephalomyelitis	klinisch nicht erkrankt, Entmarkungsherde
	%	%	%
wt-Zellklon	64,4 $\pm$ 7,1	0	25 $\pm$ 10,8
ts 42 Isolat 1027	0	35,6 $\pm$ 7,1	44 $\pm$ 9,9

Tabelle 9: Coronavirus-JHM-Infektion von Ratten

	Alter der Tiere zum Zeitpunkt der Infektion		
Viruspräparation:	saugend	20 Tage	
ungeklonter Wild-typ	akute Panenzephalitis ca. 2 - 7 Tage p.i.	subakute demyelinisierende Enzephalomyelitis ca.14-24 Tage p.i.	späte demyelinisierende Enzephalomyelitis (sehr selten)
zelladaptiertes, geklontes Virus (wt-Zellklon)	akute Panenzephalitis ca. 2 - 7 Tage p.i.	akute Panenzephalitis ca. 4 - 14 Tage p.i.	--------
ts-Mutanten, selektioniert von wt-Zellklon	akute Panenzephalitis ca. 2 - 7 Tage p.i.	subakute demyelinisierende Enzephalomyelitis ca. 12 - 24 Tage p.i.	späte demyelinisierende Enzephalomyelitis (>5 %)

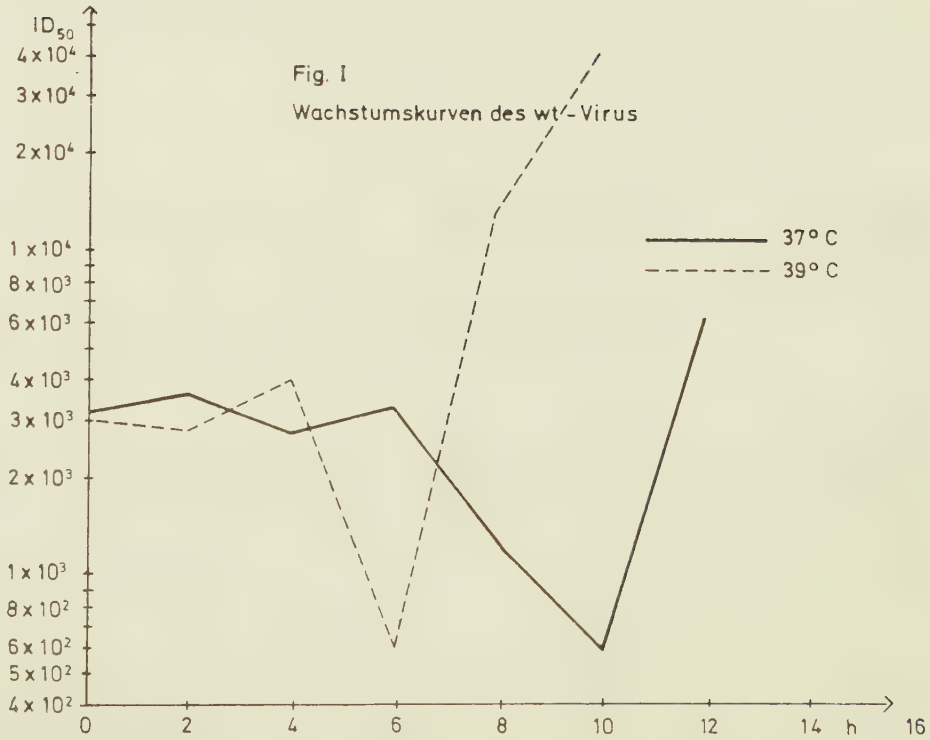


Fig. I

Wachstumskurven des wt-Virus

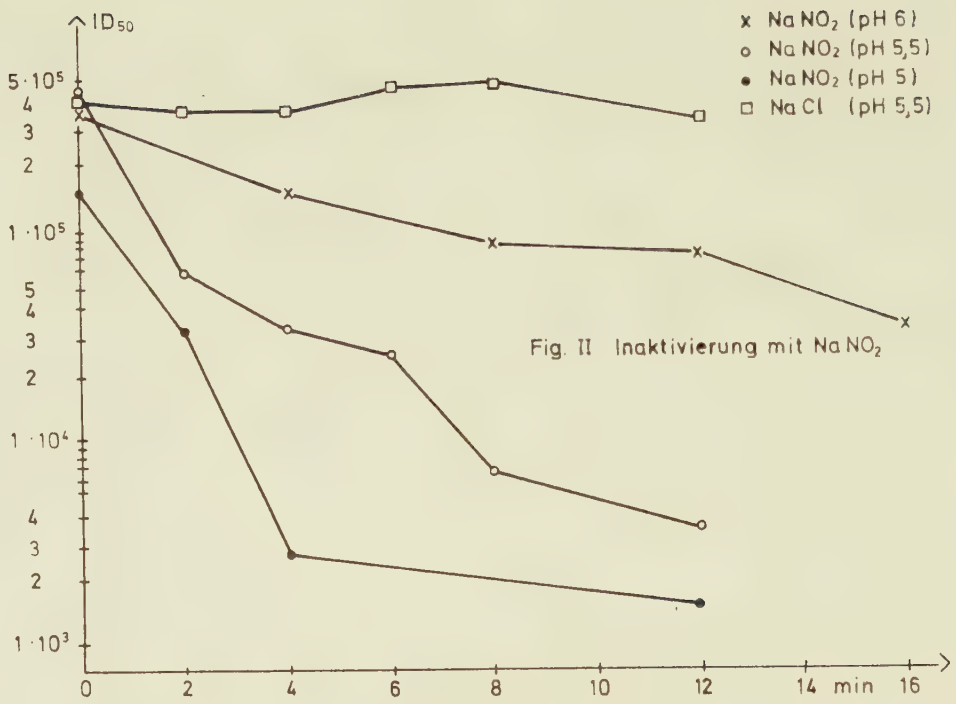


Fig. II Inaktivierung mit $NaNO_2$

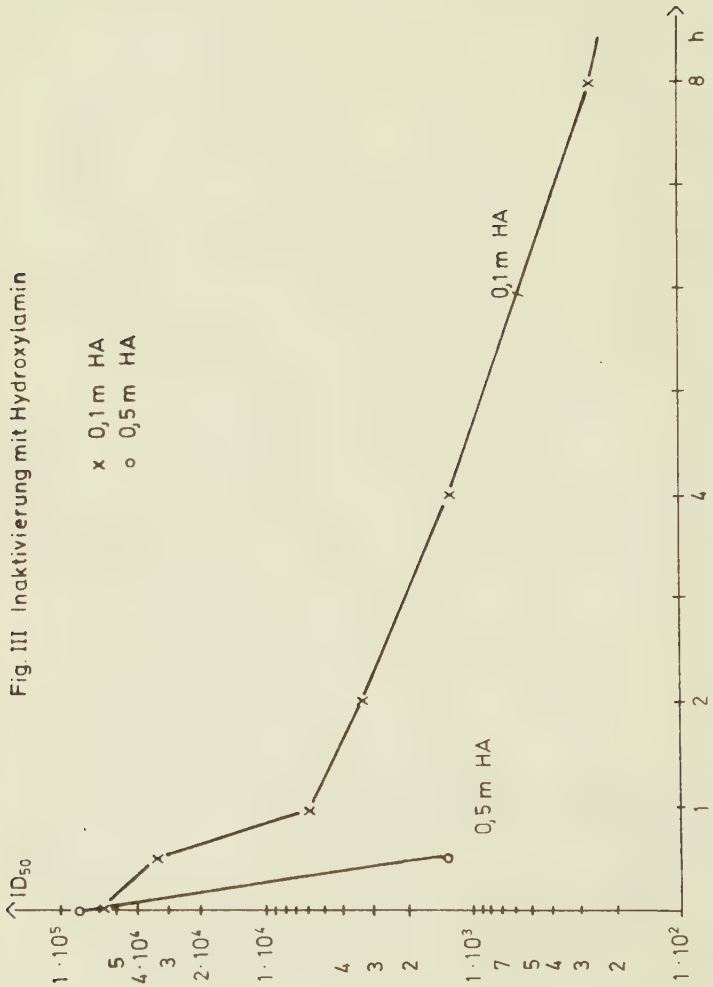
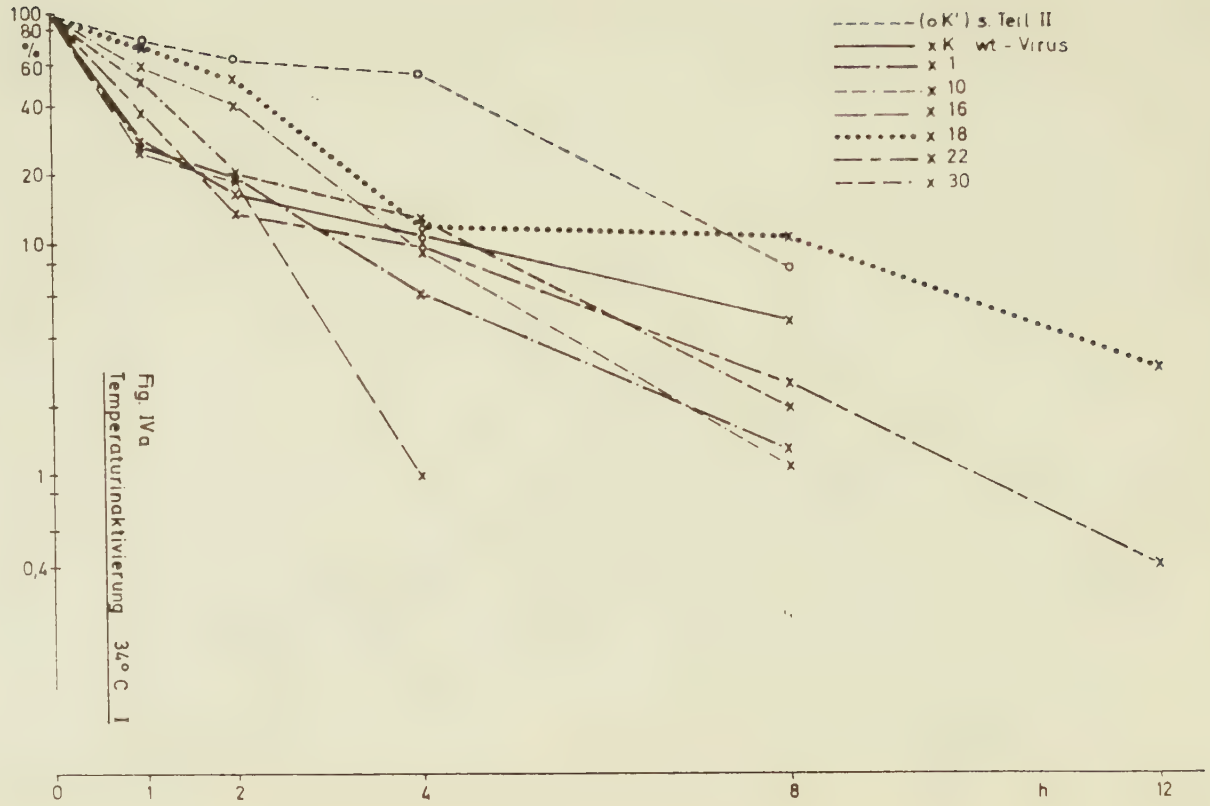


Fig. III Inaktivierung mit Hydroxylamin
x 0,1 m HA
o 0,5 m HA
0,1 m HA
0,5 m HA
ID50
1 · 10⁵
5
4 · 10⁴
3
2 · 10⁴
1 · 10⁴
4
3
2
1 · 10³
7
5
4
3
2
1 · 10²
1
2
4
8 h


100
80
%
60
40
20
10
1
0,4
0
1
2
4
8
h
12
(oK') s. Teil II
xK wt - Virus
x 1
x 10
x 16
x 18
x 22
x 30
Fig. IVa
Temperaturinaktivierung 34° C

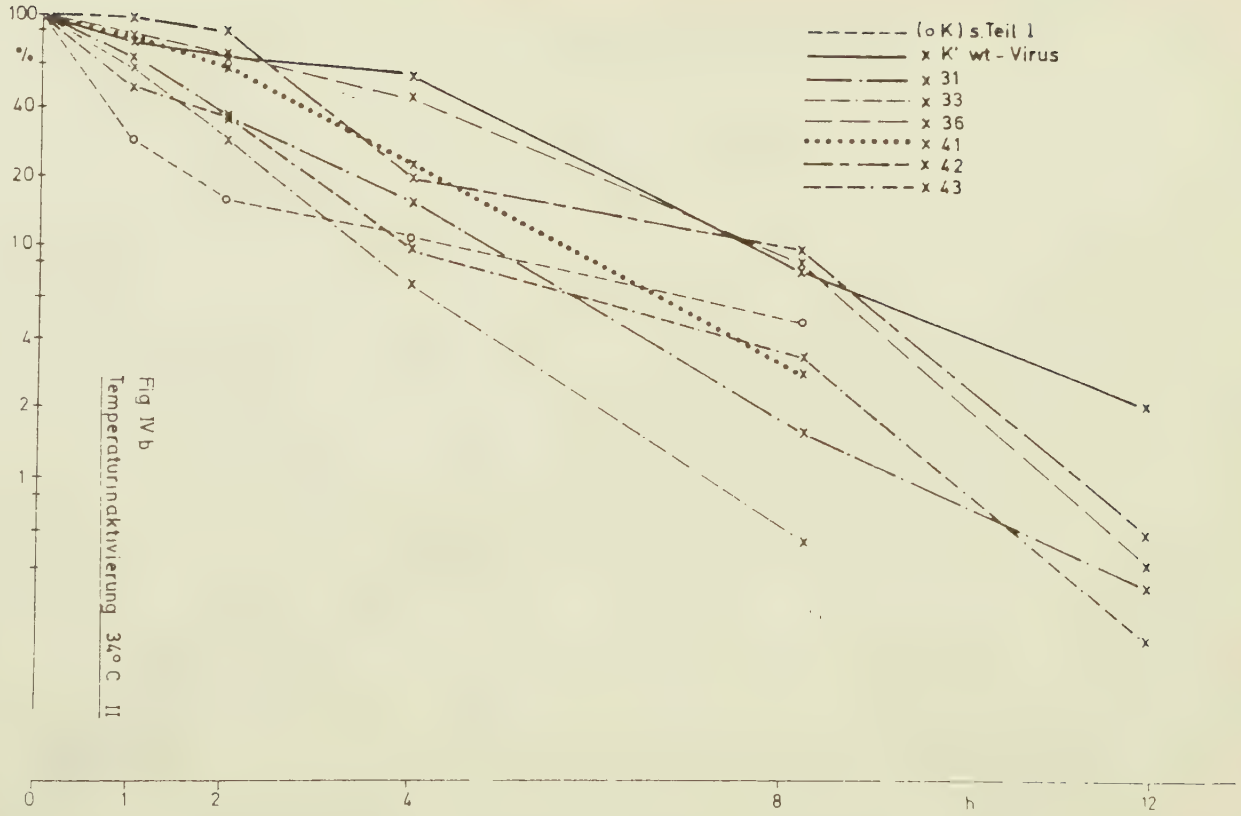


Fig IV b
Temperaturinaktivierung 34° C II

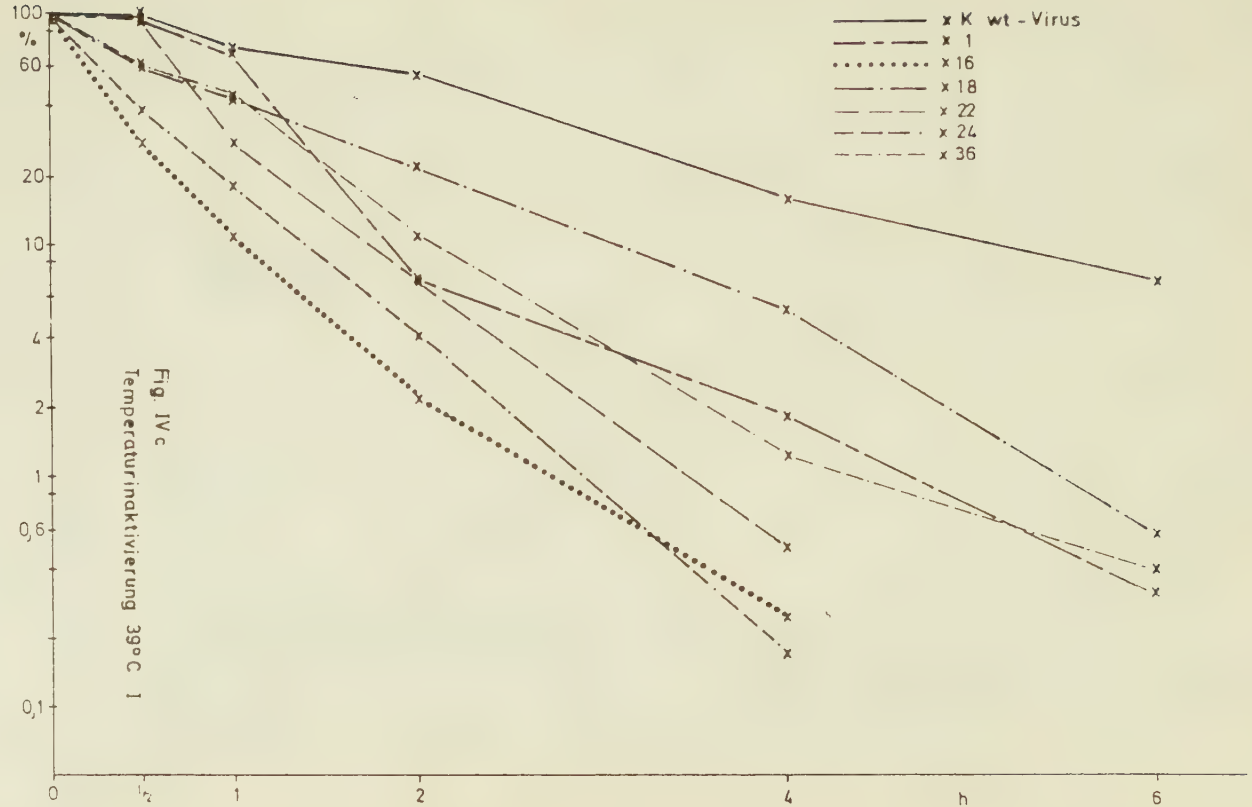


Fig. IV c
Temperaturinaktivierung 39°C

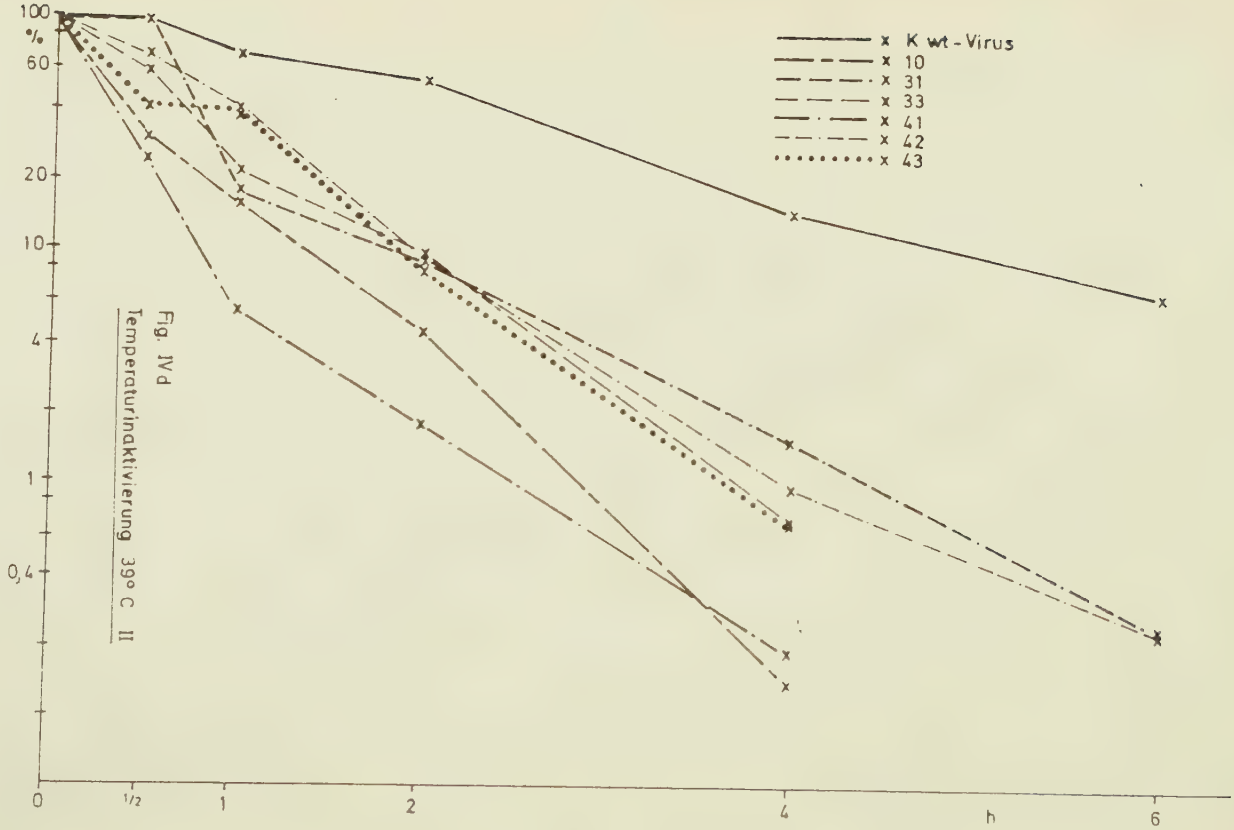


Fig. IVd
Temperaturinaktivierung 39° C II

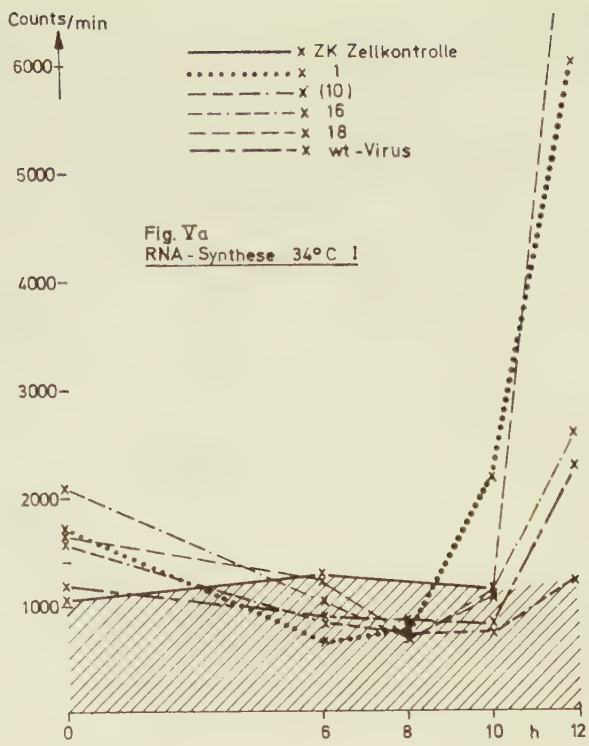


Fig. Va
RNA-Synthese 34° C I

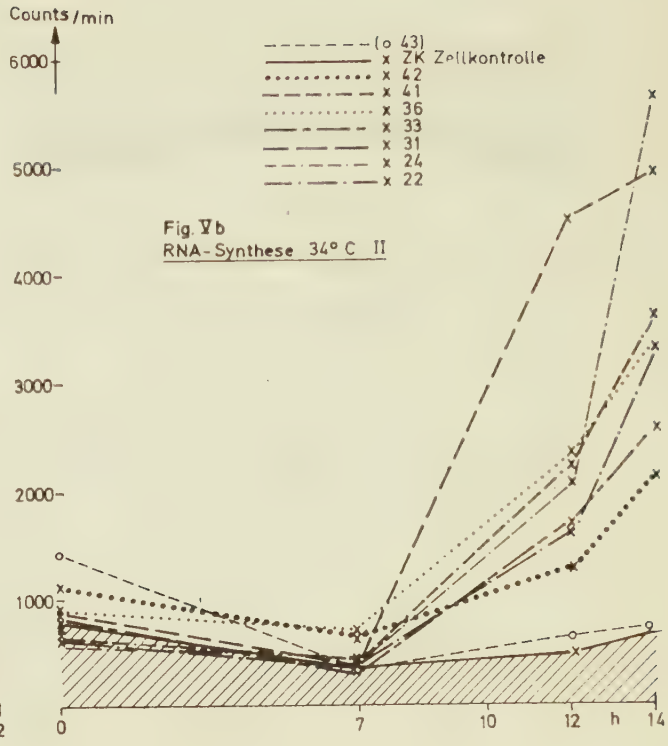


Fig. Vb
RNA-Synthese 34° C II

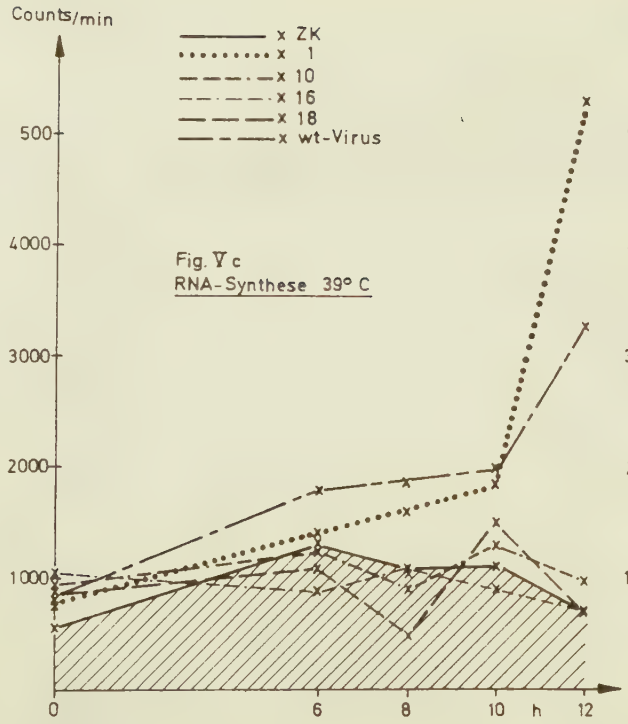


Fig. V c
RNA-Synthese 39° C

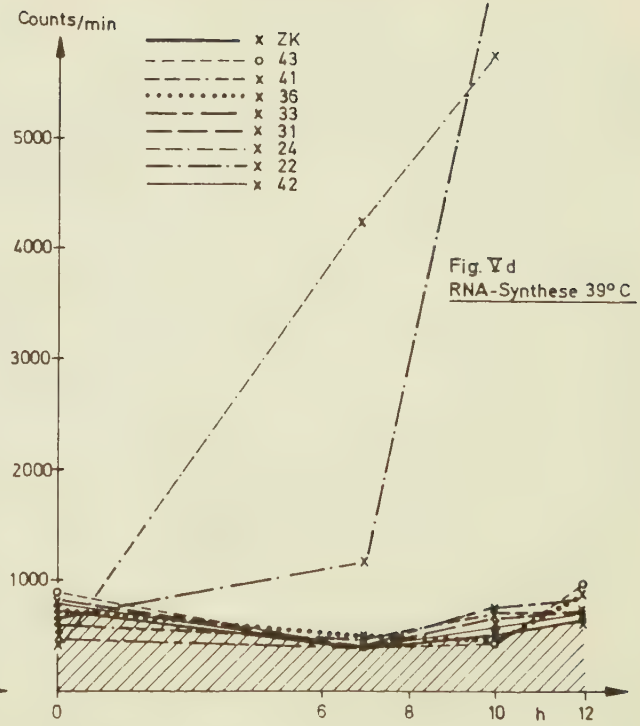


Fig. V d
RNA-Synthese 39° C

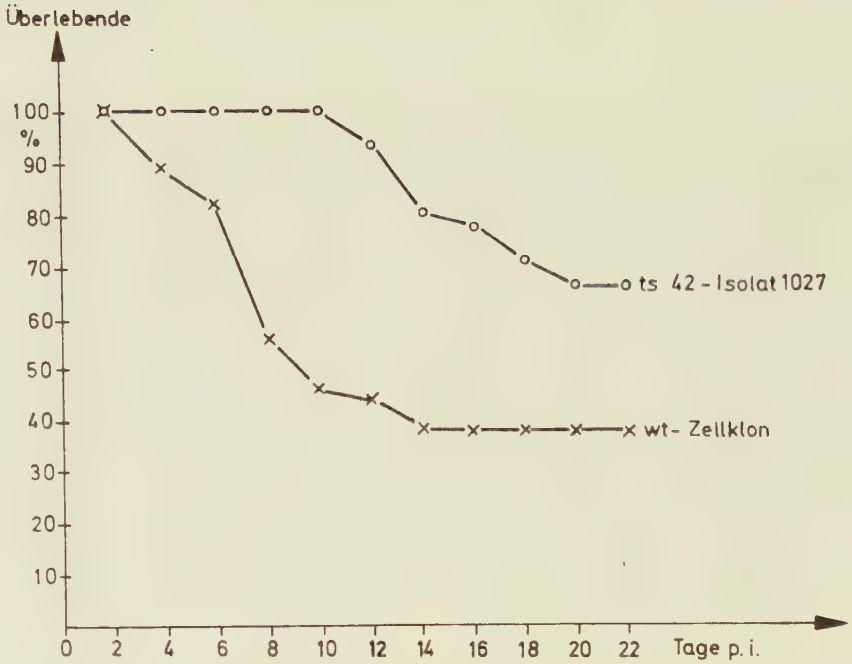


Fig. VI Überlebensrate der infizierten Ratten

Literaturverzeichnis

(1) Bailey.O.T.; Pappenheimer,A.M.; Cheever, F.S.; Daniels,J.B.:

A murine coronavirus (JHM) causing disseminated encephalomyelitis with extensive destruction of myelin, II Pathology.

J.Exp.Med. 9o, 195-212 1949

(2) Baltimore,D.:

Expression of animal virus genomes.

Bacteriological Reviews 35, 235-241 1971

(3) Bergholz,C.M.; Kiley,M.P.; Payne,F.E.:

Isolation and characterization of temperature-sensitive mutants of measles virus.

J.Virol. 16,192-2o2 1975

(4) Bonin,O.:

Quantitativ-virologische Methodik.

Thieme Verlag,Stuttgart 1973

(5) Breshkin,A.M.; Haspel,M.V.; Rapp,E.:

Neurovirulence and induction of hydrocephalus with parental, mutant, and revertant strains of measles virus.

J.Virol. 18, 8o9-811 1976

(6) Burge,B.W.; Pfefferkorn,E.R.:

Isolation and characterization of conditional-lethal mutants of sindbis virus.

Virol. 3o, 2o4-213 1966

(7) Ensinger,M.J.; Ginsberg,H.S.:

Selection and preliminary characterization of temperature-sensitive mutants of type 5 adenovirus.

J.Virol. 1o, 328-339 1972

(8) Falke,D.:

Virologie.

Springer Verlag, Berlin, Heidelberg New York 1976

(9) Fields,B.N.; Joklik,W.K.:

Isolation and preliminary genetic biochemical characterization of temperature-sensitive mutants of reovirus.

Virol. 37, 335-342 1969

(10) Fields,B.N.:

Genetic manipulation of reovirus - a model for modification of disease.

New Engl.J.Med. 287, 1026-1033 1972

(11) Forth,W.; Henschler,D.; Rummel,W.:

Pharmakologie und Toxikologie.

Bibliographisches Institut Mannheim, Wien, Zürich 1975

(12) Ghendon,Y.Z.:

Conditional-lethal mutants of animal viruses.

in Progress in Medical Virology, edited by Melnick,J.L.

S. Karger, Basel, München, Paris, London, New York, Sydney 1972

(13) Granoff,A.:

Induction of newcastle disease virus mutants with nitrous acid.

Virol. 13, 402-408 1961

(14) Hamburger,A.; Fields,B.N.:

Isolation and preliminary genetic charakterization of measles virus.

unpublished manuscript.

(15) Haspel,M.V.; Duff,R.; Rapp,F.:

Experimental measles encephalitis: a genetic analysis.

Infection and Immunity 12, 785-790 1975

(16) Haspel,M.V.; Duff,R.; Rapp,F.:

Isolation and preliminary characterization of temperature-sensitive mutants of measles virus.

J.Virol. 16, 1000-1009 1975

(17) Haspel,M.V.; Rapp,F.:

Measles virus: an unwanted variant causing Hydrocephalus.

Science 187, 450-451 1975

(18) Haspel,M.V.; Lampert,P.W.; Oldstone,M.B.A.:

Temperature-sensitive mutants of MHV produce a high incidence of demyelination.

Proc.Natl.Acad.Sc. 75, 4033-4036 1978

(19) Haspel,M.V.; Lampert,P.W.; Oldstone,M.B.A.:

Demyelination produced by wild-type and temperature-sensitive mutants of MHV Type 4 (JHM).

Cellular Biology 11, Academic Press, New York 1978
ICN-UCLA Symposium Persistent Viruses

(20) Holloway,A.F.; Wong,P.K.Y., Cormack,D.V.:

Isolation and characterization of temperature-sensitive mutants of vesicular stomatitis virus.

Virol. 42, 917-926 1970

(21) Jawetz,E.; Melnick,J.L.; Adelberg,E.A.:

Medizinische Mikrobiologie.

Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York 1973

(22) Lampert,P.W.; Sims,J.K.; Kinazeff.A.J.:

Mechanism of demyelination in JHM virus encephalomyelitis. Electron microscopic studies.

(23) Lomniczi,B.:

Biological properties of avian coronavirus TNA.

J.Gen.Virol. 36, 531-533 1977

(24) Luria,S.E.; Darnell,J.E.jr.; Baltimore,D.; Campell,A.:

General Virology.

John Wiley & Sons, New York, Santa Barbara, Chichester, Brisbane, Toronto 1978

(25) Mc Intosh,K.:

Coronaviruses: a comparative review.

Current topics in microbiology and immunology 63, 85-129 1974

(26) Nagashima,K.; Wege,H.; Meyermann,R.; ter Meulen,V.:

Coronavirus induced subacute demyelinating encephalomyelitis in rats: a morphological analysis.

Acta Neuropathol.(Berlin) 44, 63-70 1978

(27) Nagashima,K.; Wege,H; Meyermann,R.; ter Meulen,V.:

Demyelinating encephalomyelitis induced by a long-term coronavirus infection in rats.

Acta Neuropathol.(Berlin) 45, 205-213 1979

(28) Nagashima,K.; Wege,H; ter Meulen,V.:

Early and late CNS-effects of coronavirus infection in rats.

Advances in Experimental Medicine and Biology 100, 395-409 1978

(29) Pfefferkorn,E.R.:

Temperature-sensitive mutants of animal viruses: Isolation and preliminary characterization.

in Fundamental Techniques in Virology, Habel,K.; Salzmann,N.P.

Academic Press, New York, London 1969

(30) Preble.O.T.; Younger,J.S.:

Temperature-sensitive viruses and the etiology of chronic and inapparent infections.

J.Inf.Dis. 131, 467-473 1975

(31) Rabinowitz,S.G.; Dal Canto,M.C.; Johnson,T.C.:

Comparison of central nervous system disease produced by wild-type and temperature-sensitive mutants of vesicular stomatitis virus.

Infection and Immunity 13, 1242-1249 1976

(32) Rabinowitz,S.G.; Johnson,T.C.; Dal Canto,M.C.:

The uncoupled relationship between the temperature-sensitivity and neurovirulence in mice of mutants of vesicular stomatitis virus.

J.Gen.Virol. 35, 237-249 1977

(33) Ramig,R.F.; Fields,B.N.:

Revertants of temperature-sensitive mutants of reovirus: Evidence for frequent extragenic suppression.

Virol. 92, 155-167 1979

(34) Sambrook,J.F.; Padgett,B.L.; Tomkins, J.K.N.:

Conditional-lethal mutants of rabbitpox virus. I.Isolation of host cell-dependent and temperature-dependent mutants.

Virol. 28, 592-599 1966

(35) Schochetman,G.; Stevens,R.H.; Simpson,R.W.:

Presence of infectious polyadenylated RNA in the coronavirus avian bronchitis virus.

Virol. 77, 772-782 1977

(36) Simizu,B.; Takayama,M.N.:

Relationship between neurovirulence and temperature-sensitivity of an attenuated western equine encephalitis virus.

Arch.Ges.Virusforsch.34, 242 1971

(37) Stanners,C.P.; Goldberg,V.J.:

On the mechanism of neurotropism of vesicular stomatitis virus in newborn

hamsters. Studies with temperature-sensitive mutants.

J.Gen.Virol. 29, 281-296 1975

(38) ter Meulen,V.; Hall, W.W.:

Slow virus infections of the nervous system: virological immunological and pathogenetic considerations.

J.Gen.Virol. 41, 1-25 1978

(39) Tsipis,J.E.; Bratt,M.A.:

Isolation and preliminary characterization of temperature-sensitive mutants of newcastle disease virus.

J.Virol. 18, 848-855 1976

(40) Tyrrell,D.A.J.; Almeida,J.D.; Cunningham,C.H; Dowdle,W.R.; Hofstad M.S.; Mc Intosh,K.; Tajima M.; Zakstelskaya,L.YA.; Easterday,B.C.; Kapikian,A.; Bingham,R.W.:

Coronaviridae.

Intervirology 5, 76-82 1975

(41) Wege.H.; Müller,A.; ter Meulen,V.:

Genomic RNA of the murine coronavirus JHM.

J.Gen.Virol. 41, 217-227 1978

(42) Wege,H.; Wege,H,; Nagashima,K.; ter Meulen,V.:

Structural polypeptides of the murine coronavirus JHM.

J.Gen.Virol. 42, 37-47 1979

(43) Weiner,H.L.; Drayna,D.; Averill,D.R.jr.; Fields,B.N.:

Molecular basis of reovirus virulence: role of the S 1 gene.

Proc.Natl.Acad.Sc. 74, 5744-5748 1977

(44) Weiner,L.P.:

Pathogenesis of demyelination induced by a mouse hepatitis virus (JHM).

Arch.Neurol. 28, 298-3o3 1973

(45) Williams,J.F.; Gharpure,M.; Ustacelebi,S.; Mc Donald,S.:

Isolation of temperature-sensitive mutants of adenovirus type 5.

J.Gen.Virol. 11, 95-1o1 1971

L e b e n s l a u f

Karl Christoph Hügelschäffer, geb. 29.6.1953 in Würzburg

Vater: Ernst Gebhardt Hügelschäffer, geb. 25.2.1921
in Würzburg

Mutter: Charlotte Hügelschäffer, geb. Brendel
geb.12.12.1925
in Würzburg

1959 - 1963	Besuch der Volksschule Sommerhausen
1963 - 1972	Röntgen-Gymnasium Würzburg
1972 - 1979	Studium der Medizin in Würzburg

verheiratet seit 1977 mit Christiane Hügelschäffer
geb.Zucker, geb. 28.12.1951
in Bad Nenndorf

Sohn Sebastian geb. 17.11.1977 in Würzburg